

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Vít Molva

Bakterie asociované s čmelíkem kuřím (*Dermanyssus gallinae*)

Bacteria associated to red poultry mite (*Dermanyssus gallinae*)

Bakalářská práce

Školitel: doc. Mgr. Jan Hubert, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita ke získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze dne 7. května 2017

Podpis

Poděkování:

Chtěl bych zde poděkovat svému školiteli doc. Mgr. Janu Hubertovi, Ph.D., za trpělivost a obětavost při řešení mé bakalářské práce a Martinu Markovičovi za dohledání původních článků a technickou pomoc při psaní práce. Dále bych chtěl poděkovat rodině za podporu během studia.

Abstrakt

Čmelík kuří (*Dermanyssus gallinae*) (Acari: Mesostigmata) je hematofágní parazit drůbeže, okrasných ptáků, savců i lidí. Napadení drůbeže čmelíkem kuřím má negativní vliv na snášivost vajec, příbytky na váze a i fitness jedince. Při masivním napadení může dojít až k úhynu drůbeže. Za nebezpečí pro člověka se považuje možný přenos bakterií a virů čmelíkem. Předložená práce analyzuje čmelíka jako případného vektora bakterií a reviduje výskyt jednotlivých potenciálně patogenních nebo symbiotických bakterií asociovaných se čmelíkem. Čmelík je považován za vektora následujících druhů patogenních bakterií: *Salmonella* spp., původce salmonelózy, výskyt byl prokázán u čmelíka hned několikrát a to jak za pomoci PCR, tak i kultivačními metodami. Spojitost *Listeria monocytogenes* a čmelíka je popsána jako společný výskyt nikoliv jako výskyt *L. monocytogenes* v čmelíkovi. Přenos *Erysipelothrix rhusiopathiae* byl jednou studií potvrzen, ale v jiné studii se jeho přenos nepotvrdil. Nejistý je i přenos *Bartonella quintana*, původce zákopové horečky. Zde existuje jedna práce, ve které se současně vyskytuje čmelík v hnízdě vrabců u podkrovního bytu a zákopová horečka u rodiny s dobrým socioekonomickým postavením žijící v tomto bytě. Přestože je čmelík považován za vektora významných patogenních bakterií, přímo prokázaný je přenos pouze *Salmonella* spp. Ostatní bakterie se vyskytují ve čmelíkovi spíše náhodně nebo se vyskytovaly pouze ve stejný čas na stejném místě. Symbiotické bakterie asociované s čmelíkem zahrnují reprodukční parazity *Wolbachia* a *Cardinium*. Symbiotické bakterie mohou ovlivňovat populace čmelíka kuřího, avšak dosud o tom není nic známo.

Klíčová slova:

Dermanyssus gallinae, zoonóza, vektor, *Salmonella* spp., *Cardinium*, *Wolbachia*

Abstract

The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) (Acari: Mesostigmata) is a hematophagous ectoparasite of poultry, cage birds, mammals and humans. Infection of poultry by poultry red mites (PRM) induce the decrease of egg production, weight gain and fitness. The massive infestation of the PRM can cause the death of the bird. The PRM is danger for human due to his ability of transport bacteria and virus of one host to the other. This review summarize the association of putative pathogenic and symbiotic bacteria with the PRM. There are studies, when PRM is considered as a vector of pathogenic bacteria. The transmission of *Salmonella* spp. has been observed frequently using PCR and/or cultivation. *Listeria monocytogenes* has been associated with the PRM only in one study, in which is not clear if the PRM really transport this bacteria or they just appear in the same time and the same place. The transport of *Erysipelothrix rhusiopathiae* was in one work approved, but the demonstration of transport wasn't successful in other experiment. The role of the PRM in transport *Bartonella quintana* (causative agent of trench fever) is also not clear. The PRM and *B. quintana* appeared in the same time in the bird nest near the attic and there were attacked a family with high socioeconomic status by trench fever. However is the PRM consider to be a vector of many pathogenic bacteria, only the *Salmonella* spp. is clearly approved to be transmit. The other bacteria are present in the PRM rather randomly or they just occur in the same time at the same place. Symbiotic bacteria associated with the PRM include reproductive parasites *Wolbachia* and *Cardinium*. The symbiotic bacteria can affect the population of the PRM. Nevertheless the role of these bacteria hasn't been studied.

Key words

Dermanyssus gallinae, zoonoses, vector, *Salmonella* spp., *Cardinium*, *Wolbachia*

Obsah

| | |
|---|----|
| Úvod..... | 1 |
| 1. <i>Dermanyssus gallinae</i> | 2 |
| 1.1. Taxonomie..... | 2 |
| 1.2. Biologie | 3 |
| 1.3. Výskyt | 4 |
| 1.4. Význam | 4 |
| 1.5. Možnosti regulace..... | 4 |
| 2. Zoonózy..... | 5 |
| 2.1. Přenos zoonóz hematofágními členovci | 6 |
| 3. Metody detekce bakterií v čmelíkovi | 7 |
| 3.1. Kultivace bakterií..... | 7 |
| 3.2. PCR | 8 |
| 3.3. ELISA test..... | 9 |
| 4. Patogenní bakterie přenášené čmelíkem kuřím..... | 10 |
| 4.1. <i>Salmonella enterica</i> | 11 |
| 4.2. <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> | 12 |
| 4.3. <i>Chlamydia psittaci</i> | 12 |
| 4.4. <i>Pasteurella multocida</i> | 13 |
| 4.5. <i>Bartonella quintana</i> | 14 |
| 4.6. <i>Listeria monocytogenes</i> | 15 |
| 4.7. <i>Coxiella burnetii</i> | 15 |
| 5. Symbiotické bakterie čmelíka kuřího | 16 |
| 5.1. <i>Wolbachia</i> | 16 |
| 5.2. <i>Cardinium</i> | 17 |
| 6. Závěr..... | 18 |
| Definice použitých výrazů | 19 |
| Seznam použité literatury..... | 20 |

Úvod

Čmelík kuří (*Dermanyssus gallinae* (de Geer, 1778)) (Acari: Mesostigmata: Dermanyssidae) je 1,5 mm velký hematófágní parazit patřící mezi členovce (Kirkwood 1963). Jeho typickými hostiteli jsou okrasní ptáci chovaní v klecích a drůbež, na nichž parazituje v noci a ve dne je ukryt v blízkosti hnízd (Kilpinen 2005). Čmelík napadá ale i savce a člověka, u kterého způsobuje svědivou lokální vyrážku (George et al. 2015). Čmelík se celosvětově vyskytuje jak ve velkých drůbežárnách, tak i v malých domácích chovech (Sparagano et al. 2009). Čmelík přijímá krev ve všech svých vývojových stádiích s výjimkou larvy (Chauve 1998; Sparagano et al. 2009). Celý svůj vývojový cyklus je za optimálních podmínek schopný dokončit do jednoho týdne (Kirkwood 1963). Dospělci čmelíka jsou vysoce odolní vůči vyhladovění, kdy mohou přežít až 34 týdnů bez přijímání potravy (Kirkwood 1963). Sání čmelíka způsobuje drůbeži stres a anemii (Kirkwood 1967). To má negativní vliv na množství snesených vajec, příbytek hmotnosti a celkově fitness drůbeže. Při masivním napadení může dojít až k úhynu jedince (Nordenfors et al. 1999). Ochrana proti čmelíkovi je složitá vzhledem k rozšířené rezistenci vůči karbamátům a pyretroidům (De Luna et al. 2009). Účinné širokospektré pesticidy jsou ve většině vyspělých států zakázány z důvodu možnosti kontaminace masa a vajec (Marangi et al. 2012). Hematófágní členovci jsou obecně problematictí z důvodu přenosu bakterií. Přenos je možný díky opakovanému sání na různých hostitelích, a tedy existuje možnost infikovat dalšího hostitele za pomoci bakterií ukrytých ve slinných žlázách (Slifko et al. 2000). Čmelík je přenašečem patogenních bakterií (Chauve 1998). Můžeme u něj nalézt ale i bakterie, které jsou pro čmelíka symbiotické (De Luna et al. 2009). V literatuře jsou spojovány bakterie s přenosem skrz čmelíka. Mnoho zdrojů však vychází z 40–60 let starých pozorování založených na kultivačních postupech, které nejsou propojeny s novými pozorováními založených na sekvenačních metodách identifikace mikroorganismů. Proto je potřeba literární rešerše těchto studií, která porovná kultivační a sekvenační techniky a reviduje spektrum bakterií asociovaných s čmelíkem. Tento krok je nezbytným předpokladem zacílení dalšího výzkumu asociací bakterií a čmelíka. Cílem této bakalářské práce je literární rešerše dostupných materiálů o biologii a ekologii čmelíka kuřího včetně možnosti regulace výskytu čmelíka. Dále popíše vztah zoonóz s hematófágními členovci jako jejich častými přenašeči. Pozornost bude věnována i detekčním metodám bakterií v hostiteli. Hlavním úkolem této práce je identifikovat bakterie přenášené čmelíkem kuřím a to jak patogenní, tak symbiotické.

1. *Dermanyssus gallinae*

1.1. Taxonomie

Čmelík kuří (*D. gallinae*) patří do čeledi *Dermanyssidae*, podřádu *Mesostigmata*, řádu *Acari* (roztoči), třídy *Arachnida* (pavoukovci), podkmene *Chelicerata* (klepítkatci), kmene *Arthropoda* (členovci), říše Opisthokonta a domény Eukaryota (EOL 2017). Do čeledi *Dermanyssidae* patří také např. čmelík vlaštovčí (*D. hirundinis*), čmelík myší (*D. sanguineus*) nebo čmelík hnízdový (*D. chelidonis*) (Hájková et al. 1979).



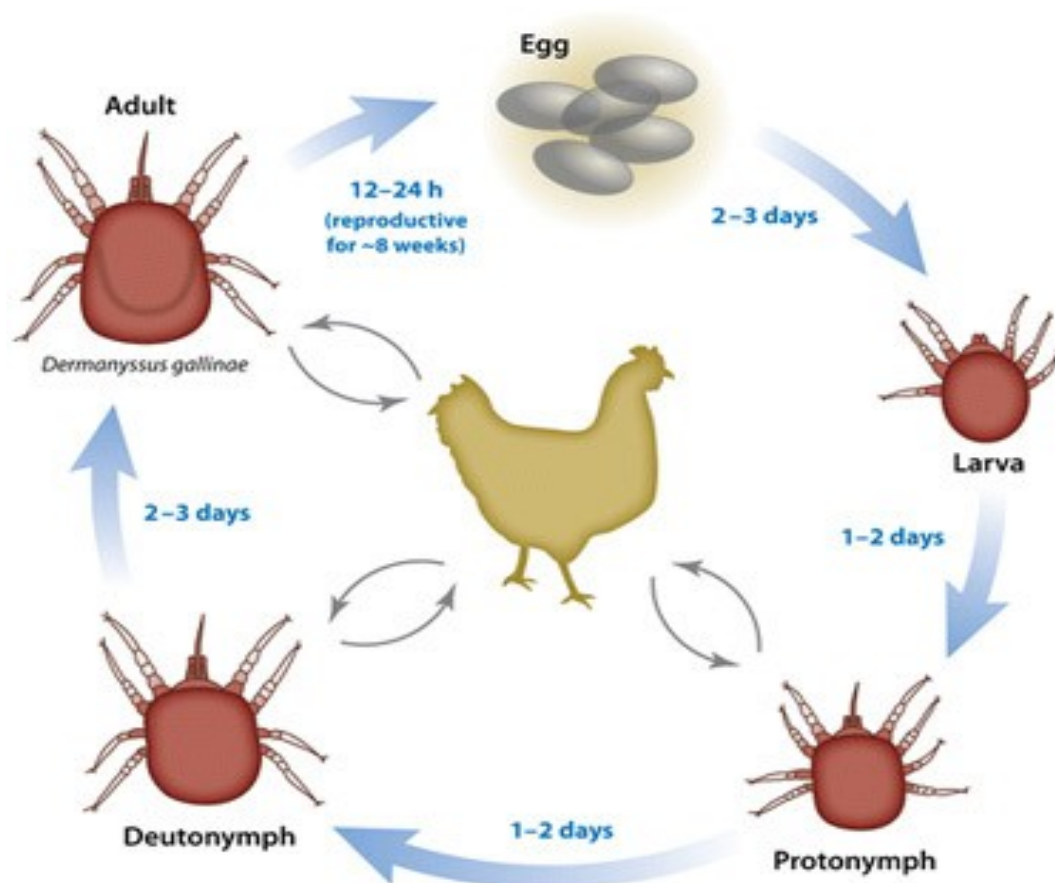
Obrázek 1. *Dermanyssus gallinae*

Mezi taxonomické znaky čeledi *Dermanyssidae* patří tělo velké do 2,5 mm pokryté štětínami (viz obrázek č. 1). Na dorzální (hřbetní) straně těla je jednolitý štítek (hřbetní štítek), který zakrývá téměř celou stranu těla. Na ventrální (břišní) straně těla má samice 3 štítky (sternální, genito-ventrální a anální). U samce je často počet štítků menší. Štítky mohou splývat ve dva (sternogenitální a ventrianální) nebo dokonce v jediný holoventrální štítek (Hájková et al. 1979).

1.2. Biologie

Čmelík je 1,5 mm velký ektoparazit ptáků. Zbarven je nejčastěji žlutohnědě, ale po nasátí krve se barví do červena. Patří mezi krev sající roztoče. Hlavním hostitelem jsou ptáci. Můžeme jej nalézt jak na drůbeži, tak i na divokých a okrasných ptácích (Chauve 1998). Na hostiteli saje výhradně v noci a přes den se schovává v zákoutích hnízd, kurníků a klecí (Kilpinen 2005). Čmelík je schopný přežít dlouhou dobu, aniž by přijímal potravu, což ztěžuje možnost jeho likvidace (Kirkwood 1963).

Vývoj čmelíka je velmi rychlý, za optimálních podmínek (25–30 °C) trvá 6–7 dnů (Tucci et al. 2008). Životní cyklus čmelíka popisuje obrázek č. 1. Na hostiteli sají jak dospělci, tak i protonymfy a deuteronymfy. Larva je velmi málo pohyblivá, šestinohá a nesaje na hostiteli (Sparagano et al. 2014).



Obrázek 2. Životní cyklus *D.gallinae* (Sparagano et al. 2014)

1.3. Výskyt

Čmelík se vyskytuje po celém světě s výjimkou polárních oblastí. Dobře zmapovaný je jeho výskyt v Evropě (Marangi et al. 2014; De Luna et al. 2009), Japonsku (Chu et al. 2015), Číně (Wang et al. 2010a), Izraeli (Rosen et al. 2002) a Spojených státech (USA), kde je jeho zastoupení nízké. Více se v USA vyskytuje čmelíkovec ptačí (*Ornithonyssus sylviarum*), který je čmelíkovi velice podobný (Phillis et al. 1976).

Často se čmelík vyskytuje v severní Evropě. V severní Anglii byl prokázán v 87,5 % zkoumaných drůbežárnách a kurnících (Guy et al. 2004) a ve Francii v 75 % sledovaných drůbežárnách (Sparagano et al. 2009).

1.4. Význam

Čmelík způsobuje ekonomické škody v drůbežárnách. Sáním krve z nosnic a kuřat zpomaluje jejich přírůstek na váze a při masivním napadení může dojít i k úhynu drůbeže. Sání čmelíka na drůbeži je pro ni stresující. To má negativní dopad i na produkci vajec nosnicemi. Pouze v Evropě byly ekonomické škody způsobené čmelíkem vyčísleny na 130 milionů eur/rok (Sparagano et al. 2009). Předpokládá se, že podobné škody způsobil i na ostatních světadílech.

Čmelík je schopný sát krev i na savcích včetně člověka, u kterého způsobuje nepříjemné dermatitidy (Auger et al. 1979) a je zodpovědný za přenos některých pro člověka patogenních bakterií (Valiente Moro et al. 2009).

1.5. Možnosti regulace

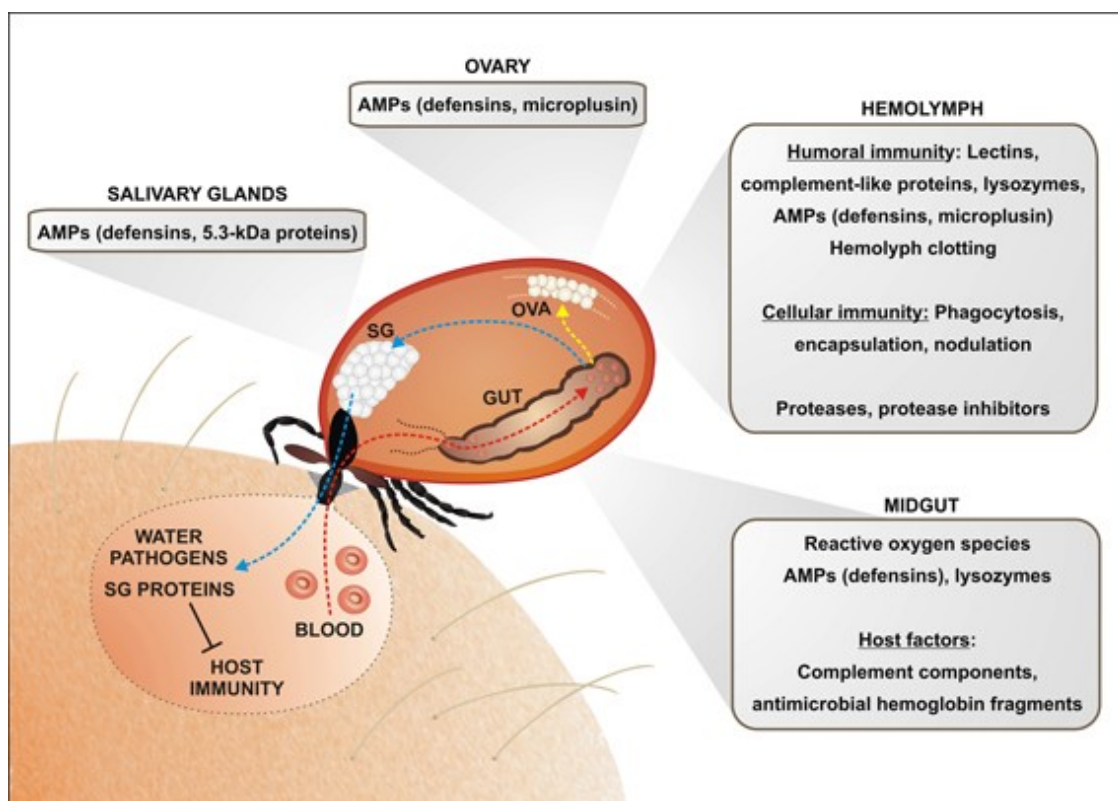
Vzhledem k ekonomickým škodám způsobených čmelíkem bylo vypracováno mnoho článků a studií, jak čmelíka vyhubit. Nejčastěji byly proti čmelíkovi používány širokospektré pesticidy (Roy et al. 2009; Marangi et al. 2012). V současné době je používání některých syntetických akaricidů (např. karbaryl a fenitrothion) v Evropské unii (EU) zakázáno, protože se tyto látky dostávají také do masa drůbeže a do vajíček (Marangi et al. 2012). Navíc byla u čmelíka prokázána resistance vůči karbamátům a pyrethroidům (Thind & Ford 2007). Velmi dobrý účinek na hubení čmelíka byl prokázán u kombinace látek karvakrolu a thymolu v poměru 4:1 (Masoumi et al. 2016) a také oleje z levandule (Nechita et al. 2015).

V Česku je na trhu běžně dostupný přípravek Rebel čmelíkostop. Čmelíkostop se aplikuje na stěny a vybavení kurníku, nikoli přímo na drůbež. Drůbež musí být až do zaschnutí mimo dosah postřiku. Tento přípravek obsahuje 3 látky. Fenoxycarb působí jako

inhibitor juvenilního hormonu. Inhibice způsobí neschopnost dosažení dospělosti jednotlivých vývojových stádií. Insekticidní látka čmelíkostopu je deltamethrin. Poslední látkou je piperonylbutoxid, který sám o sobě není insekticidní, ovšem napomáhá udržení deltamethrinu v těle čmelíka.

2. Zoonózy

Zoonózy jsou nemoci zvířat, které mohou být přeneseny na lidi a z pravidla nejsou přenášeny z člověka na člověka (Hubálek & Rudolf 2011). Člověk může sloužit jako příležitostný hostitel, eventuálně mezipřenositel. Přenos zoonóz může probíhat přímo z nakaženého zvířete nebo za pomoci vektoru (např. hematofágní členovec). Do člověka se zoonózy dostávají společně s potravou (nakažené maso, syrová zelenina a ovoce), znečištěnou vodou nebo přímým kontaktem člověk–zvíře (Slifko et al. 2000). Mezi významné zoonózy patří např. vzteklina (Warrell & Warrell 2004), klíšťová encefalitida (Daniel et al. 1998), lymeská borelióza (Reed et al. 2003) a salmonelóza (Humphrey 1994).



Obrázek 3. Přenos zoonóz (Hajdušek et al. 2013)

2.1. Přenos zoonóz hematofágními členovci

Hematofágní členovci patří celosvětově k nejvýznamnějším vektorům zoonóz. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) přenáší 7 z 10 nejvýznamnějších onemocnění. K hematofágnímu způsobu života museli členovci přizpůsobit trávicí soustavu (Volf & Horák 2007). První změna proběhla hned na úrovni ústního ústrojí, která se přizpůsobila ke schopnosti propíchnutí pokožky hostitele a sání krve. Čmelík patří mezi telmofágní hematofágy, tzn. že saje krev z hematomů vytvořených pod pokožkou hostitele a ne přímo z cév (Mans et al. 2002). Hematofágie s sebou nese i nutnost zabránit hostiteli v jeho obraně. V tom mu pomáhají slinné žlázy, které obsahují proteiny zabraňující hostiteli v hemostázi (srážení krve) a vytvoření zánětu. Pokud by nebyly přítomny tyto proteiny, v místě kousnutí by se ihned vytvořila krevní sraženina a členovec by nebyl schopen sání (Chmelař et al. 2016). Mezi tyto enzymy patří např. apyrázy, které štěpí ADP a ATP vznikající v poškozených buňkách. Následuje trávení krve v trávicím traktu členovce. Nejprve je z krve odstraněna přebytečná voda (diuréze). Tím se krev zahustí a hematofág je schopen nasát více živin. Diuréze probíhá v mesodeu, kde je voda absorbována a přes malpighické trubice vyloučena z těla (Volf & Horák 2007). Ve středním střevě (mesodeu) je potřeba neutralizovat cizorodý hemoglobin, proteiny a protilátky obsažené v krvi hostitele (Chmelař et al. 2016). Hemoglobin je nejprve štěpen přímo v mesodeu endopeptidázami na kratší peptidy, které následně prochází přes peritrofickou matrix. Peritrofická matrix je složená z chitinu a je semipermeabilní. Slouží jako ochrana epitelu střeva před přímým kontaktem s krví a jedná se o mechanickou překážku před vstupem mikroorganismů do těla členovce. U některých členovců se peritrofická matrix syntetizuje pouze po nasátí krve (diskontinuálně), u ostatních je produkována ihned po vylíhnutí dospělého (kontinuálně). Po průchodu peritrofickou matrix jsou peptidy štěpeny exopeptidázami a uloženy do epitelových buněk (Volf & Horák 2007).

Hematofágové během sání nasávají s krví i bakterie a viry přítomné v krvi hostitele. Jejich snahou je se v hematofágovi dostat z trávicí soustavy do slinných žláz, aby se mohly při dalším sání znovu dostat do jiného hostitele (Chmelař et al. 2016). První překážkou je pro ně peritrofická matrix. Patogeny mají dvě možnosti, jak se dostat z mesodea. Buď musí být dostatečně rychlí a dostat se ze střeva dříve, než se dosyntetizuje peritrofická matrix, nebo mohou mít enzymy (chitinázy), kterými peritrofickou matrix naruší a dostanou se mimo mesodeum (Volf & Horák 2007). Druhou překážkou je imunitní systém hematofága, kterému se musí patogen vyhnout. V hemolymfě, kterou musí patogen putovat do slinných žláz, se vyskytují hemocyty, které jsou schopny pomocí lektinů zneškodnit patogena. Ve slinných žlázách

bakterie zůstávají a čekají na další sání. Poté putují společně se slinami do hostitele. (Chmelař et al. 2016).

Vektoři zoonóz mohou přenášet zoonózy buď biologicky nebo mechanicky. Biologický přenos je typ přenosu, kdy se patogen v přenašeči vyvíjí a množí. Podle toho, zda se patogen ve vektoru množí nebo vyvíjí, můžeme rozlišovat přenos propagační (patogen se pouze množí), cyklický (patogen se pouze vyvíjí) a cyklopropagační (patogen se množí i vyvíjí). Oproti tomu během mechanického přenosu se patogen ve vektoru nemnoží ani nevyvíjí (Hubálek & Rudolf 2011).

3. Metody detekce bakterií v čmelíkovi

Zkoumání výskytu bakterií v hostiteli patří k nejdůležitějším mikrobiologickým disciplínám. Využití nachází jak ve zdravotnictví, kde lze proti konkrétní bakterii nasadit účinnou léčbu, tak v potravinářském průmyslu, kde se např. zkoumá, zda není maso napadeno bakteriemi.

Používané metody k detekci můžeme rozdělit na kultivačně závislé a na kultivačně nezávislé. Kultivačně nezávislé spočívají v rozvoji molekulárně biologických metod, jako je PCR nebo ELISA test. Mimo tyto skupiny poté stojí manipulativní pokusy, kdy dochází k experimentální nákaze a sledování přenosu a výskytu bakterie.

3.1. Kultivace bakterií

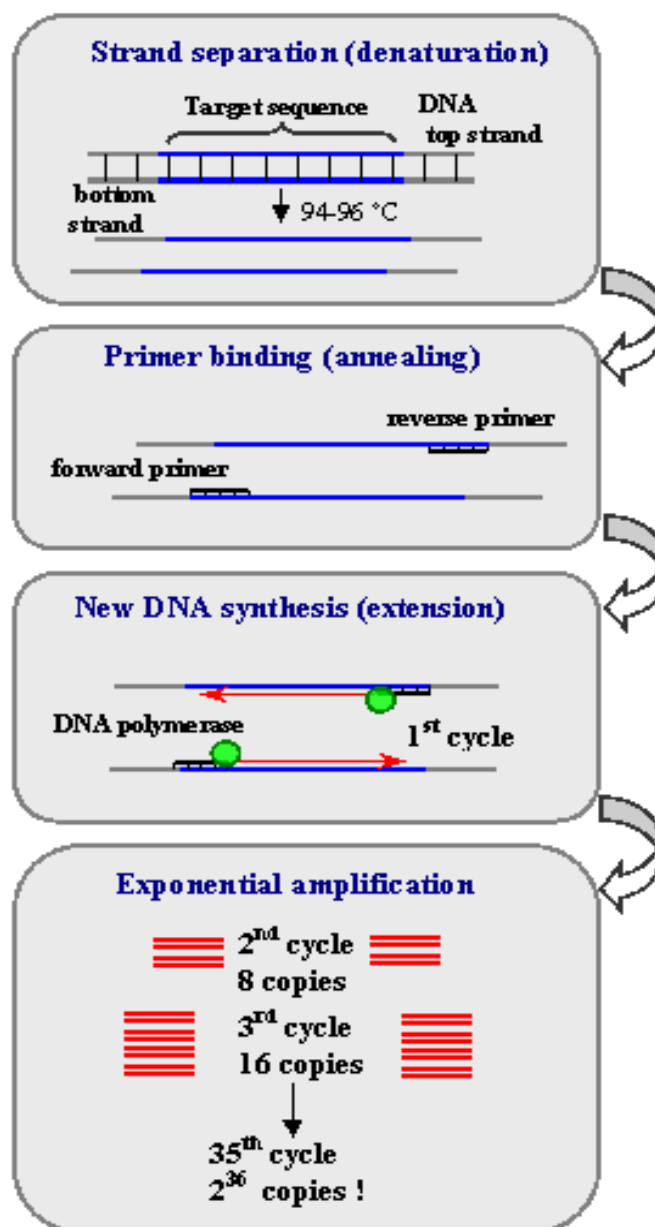
Mezi prvními se začala používat metoda kultivace bakterií z čmelíka. Detekce bakterií kultivací patří mezi nejjednodušší a nejpřímější metody. Problémem je nízké procento bakterií, které lze vykultivovat. Obecně se tvrdí, že lze vykultivovat něco mezi 0,1–10 % bakterií (Uhlík et al. 2013). Mezi další významné nevýhody patří časová náročnost této kultivace. Běžně trvá několik dní až týdnů, než se podaří vykultivovat danou kulturu. Při kultivaci lze použít univerzální agarové médium, na kterém jsou schopné růst různé druhy bakterií (používá se při kultivaci, kdy chceme zjistit, které bakterie hostitel obsahoval) nebo lze použít specifické médium, na kterém roste pouze určitá skupina bakterií (chceme zjistit, zda hostitel obsahoval konkrétní bakterii). Dále lze využít inhibiční média pro určité skupiny, která ostatním nevadí (pokud víme, že tyto bakterie tam jsou, ale nemáme zájem je kultivovat, pouze by překážely ostatním) (Lazeka et al. 2007).

Kultivační metodou byla zjišťována přítomnost např. *Chlamydie psittaci*. Zde bylo

použito jak nespecifické médium (krevní agar), tak specifické médium pro gramnegativní bakterie (MacConkeyův agar). Kultivovány byly pouze vzorky z ptáků nikoliv z čmelíka. Kultivace probíhala za aerobních i anaerobních podmínek a krevní vzorky byly získány z jater, plic, sleziny a srdce. Kultivace probíhala 24 hodin při 37 °C (Circella et al. 2011).

3.2. PCR

Polymerázová řetězová reakce je metoda používaná k amplifikaci (zmnožení) nukleových kyselin. Vynalezena byla v osmdesátých letech 20. století Kary Mullisem. Největší výhodou PCR oproti kultivaci je její rychlost (průběh PCR trvá řádově hodiny) a její vysoká detekční schopnost (Joshi & Deshpande 2011). Tato metoda je založena na mnohonásobném zmnožení vzorové DNA za pomoci termostabilní DNA polymerázy. Regulována je za pomoci primerů (krátké oligonukleotidy), které nasedají na molekuly DNA a umožňují její replikaci (Houghton & Cockerill 2006). Pro PCR se používá DNA o délce maximálně 2000 bází. Pokud je molekula DNA delší, zvyšuje se riziko chyby DNA polymerázy. Pro PCR je zapotřebí několik komponentů: DNA polymeráza, DNA templát, primer a nukleotidy. Amplifikace probíhá díky 3 opakujícím se krokům.



Obrázek 4. Princip PCR (NCBI 2017)

Nejdříve DNA denaturujeme. Denaturace probíhá při vysokých teplotách 94–96 °C.

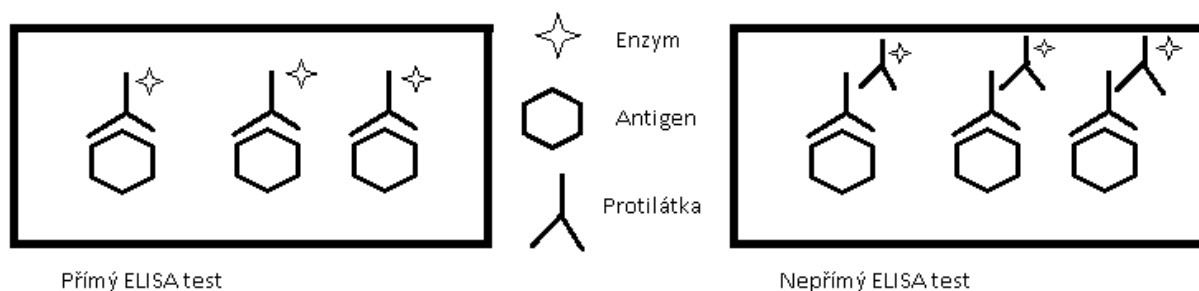
Výsledkem jsou jednovláknové řetězce DNA. Druhou fází je annealing, kdy dochází k nasedání primerů na jednovláknové řetězce DNA. Tento krok probíhá za nižších teplot než denaturace (mezi 50 a 65 °C). Třetím krokem je syntéza nové DNA za pomoci DNA polymerázy, která se napojuje na primer a zkopíruje původní vlákno. Tyto tři kroky se mnohokrát opakují a počet kopií exponenciálně roste (Joshi & Deshpande 2011). Pro určení bakterií se nejčastěji používá sekvenování genu kódujícího 16S ribosomální RNA. Tento gen mají všechny bakterie a obsahuje konzervované i variabilní sekvence (Jenkins et al. 2012). U PCR tedy nehledáme přímo bakterie, ale jejich geny. Výsledkem je určitá pravděpodobnost, se kterou se daný gen v jedinci objevil.

Sekvenování 16S rDNA bylo využito např. při detekci *Salmonella* spp., kde byl použit specifický primer pro rod *Salmonella* a bakterie byla nalezena v 61 % čmelíků (Valiente Moro, et al. 2007a). Nevýhodou je, že v některých případech nelze dle 16S rDNA sekvence bakterie identifikovat až na druhovou úroveň. Sekvenování jiného genu bylo provedeno při detekci *Bartonella quintana*. Zde se podařilo získat sekvenci se 100% shodou s *htrA* genu *Bartonella quintana* (Melter et al. 2012a, b). Metodu využívající rozdělení 16s rDNA pomocí teplotní gradientu elektroforézního gelu využila Valiente Moro et al. 2009 při detekci sekvence 100% identické *Pasteurella multocida*. Zde byly amplifikovány velmi krátké úseky o 180 bp. Pomocí sekvenování tzv. next generation bylo Illumina amplicon sekvenováním na přístroji Illumina MiSeq ve čmelíkovi analyzováno široké spektrum bakterií, avšak sekvence patogenních bakterií se vyskytovaly pouze s nízkou četností nebo nízkou pravděpodobností (Hubert et. al 2017).

3.3. ELISA test

Další metodou, kterou lze získat data o přítomnosti bakterie v hostiteli, je ELISA test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Při této metodě nedochází k přímé detekci bakterie, ale je zaměřena na specifické protilátky nebo antigeny přítomné v hostiteli. Protilátky jsou imunoglobuliny, které vznikají v plazmatických buňkách z B-lymfocytů po setkání s konkrétním antigenem. Antigeny jsou tělu nevlastní látky, které vyvolávají specifickou imunitní odpověď (Clark & Adams 1977). Při ELISA testu je potřeba nejprve odstranit protilátky, které se na antigen nenavázaly, aby nedošlo k chybně pozitivnímu výsledku. Následně je potřeba navázané protilátky zviditelnit. K tomu se používá specifický enzym, který po navázání s protilátkou barevně reaguje s přidaným substrátem. Existují 3 základní typy tohoto testu. Přímý test spočívá v nanesení již enzymem značených primárních protilátek na antigen, které barevně reagují se substrátem. Nepřímý test probíhá tak, že na antigeny jsou

naneseny primární neznačené protilátky a teprve k nim jsou následně připojeny značené sekundární protilátky. Teprve sekundární protilátky reagují se substrátem (viz obrázek č. 5). Třetím typem je tzv. sandwich ELISA test. Jedná se o stejný princip jako je popsán u předešlých typů, pouze jsou na pevnou fázi nejprve připevněny protilátky a teprve na ně se přidává označený antigen (Crowther 2001).



Obrázek 5. Přímý a nepřímý ELISA test

ELISA test byl použit při zkoumání možnosti přenosu *Erisipelothrix rhusiopathiae* čmelíkem, jako metoda detekce *E. rhusiopathiae* v jednotlivých slepicích. ELISA test tedy nebyl prováděn přímo na čmelíkovi, ale na slepicích na kterých čmelík sál krev. Při tomto testu byla použita nepřímá metoda a jako antigen byl použit extrakt z bakterie, kterým byly slepice experimentálně nakaženy. Sérum s eventuálními protilátkami bylo použito z původně neinfikovaných slepic, aby bylo zjištěno, zda došlo k přenosu z jedné slepice na jinou. Následně došlo k promytí, aby byly odstraněny nenavázané protilátky. Poté byly přidány králičí protilátky (specifické proti IgG slepic) s navázaným enzymem. Ten byl zviditelněn díky přidanému substrátu (Brännström et al. 2010).

4. Patogenní bakterie přenášené čmelíkem kuřím

O čmelíkovi jako přenašeči bakterií není mnoho současných materiálů. V jedné studii (Valiente Moro et al. 2009) bylo za pomoci PCR prokázána spousta bakterií, které byly uvnitř čmelíka. Tyto bakterie poté autor rozdělil na patogenní a symbiotické. Dále není tato práce komentována. Významné bakterie spojované s čmelíkem jsou uvedeny v tabulce č. 1.

| Bakterie | Autor | Analýza | Nemoc |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------|-------------|
| <i>Salmonela</i> spp. | (Valiente Moro et al. 2007a) | PCR | Salmonelóza |
| <i>Erisipelothrix rhusiopathiae</i> | (Chirico et al. 2003) | Kultivace, ELISA | Červenka |

| | | | |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------|------------------|
| <i>Chlamydia</i> spp. | (Circella et al. 2011) | PCR | Psitakóza |
| <i>Pasteurela multocida</i> | (Petrov 1975) | Kultivace | Pasteurelóza |
| <i>Bartonella quintana</i> | (Melter et al. 2012a, b) | PCR | zákopová horečka |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | (Grebeňuk et al. 1972) | Demonstrováný přenos | Listerióza |
| <i>Coxiella burnetii</i> | (Zemskaja & Pčelkina 1967) | Kultivace | Q horečka |

Tabulka č. 1. Patogenní bakterie asociované s čmelíkem kuřím

4.1. *Salmonella enterica*

Rod *Salmonella* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o fakultativně anaerobní gramnegativní bakterie schopné pohybu, způsobující celosvětově jedno z nejzávažnějších zoonotických onemocnění (Cangelosi et al. 2015). Rod *Salmonella* je zastoupen pouze jedním druhem (*Salmonella enterica*), nicméně je známo více než 2000 sérovarů tohoto rodu z nichž cca 100 je infekčních pro člověka (Hubálek & Rudolf 2011). Mezi běžné hostitele patří drůbež a prasata. Prokázána byla ale i v členovcích (Davies & Breslin 2003). U zvířat většinou nezpůsobuje zjevné onemocnění. Výjimkou je např. *S. pullorum*, která způsobuje akutní průjmy drůbeže, končící často úhynem zvířete. Pro člověka je tento typ *Salmonella* ze zdravotního hlediska prakticky nepodstatný (Hubálek & Rudolf 2011). V Česku probíhá program Státní veterinární správy ČR pro tlumení salmonel, který má zajistit potlačení výskytu bakterie v českých chovech. Jedná se o pravidelné kontroly trusu drůbeže v drůbežárnách na produkci vajec, značení vajec kódem k snadnému identifikování původu vejce apod. (SVS ČR 2017).

Nákaza člověka je spojena s akutním průjmovým onemocněním a zvýšenou teplotou. Salmonelóza se vyznačuje velmi krátkou inkubační dobou. Nebezpečná je zvláště pro děti a starší osoby, u kterých může způsobit až smrt. V Česku se ročně vyskytnou desítky tisíc případů nákazy salmonelózou. Salmonelóza se šíří alimentární cestou z nakaženého masa nebo vajec (Hubálek & Rudolf 2011).

Spojitosť *Salmonella* spp. a čmelíka byla experimentálně prokázána. Experiment proběhl na francouzské farmě, kde se *Salmonella* nikdy nevyskytla a která byla nakažena čmelíkem. Čmelík byl podroben kultivačnímu testu na selektivním médiu, aby byla dokázána nepřítomnost *Salmonella* spp. v čmelíkovi. Vzorek *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotyp *Enteritidis* (*Salmonella enteritidis*) byl vzat z laboratoře v Ploufragan (Francie).

Čmelík byl nakažen salmonelou dvěma způsoby. Jedna skupina čmelíků byla infikována skrz kutikulu a druhá pomocí nakažené krve. Druhá skupina byla omyta, aby byl vyloučen přenos bakterie na povrchu čmelíka. Čmelík se stal hostitelem *Salmonella enteritidis* v 53 % při nákaze skrz kutikulu a v 29 % při nákaze krví (Valiente Moro et al. 2007b). Další práce pojednává o kultivaci *Salmonella* spp. přímo ze čmelíka v nakažené drůbežárně. Zde byl čmelík odchycen a zbaven povrchových nečistot. Následná kultivace probíhala na ovčím krevním agaru a Endo (selektivní medium pro *Enterobacteriaceae*). Bakterie byly identifikovány za pomoci povrchových antigenů a biochemických vlastností (Zeman et al. 1982).

4.2. *Erysipelothrix rhusiopathiae*

E. rhusiopathiae je fakultativně anaerobní grampozitivní bakterie (Tan et al. 2017). Hostitelem jsou pro ní zvířata, zejména pak prasata a ryby (Romney et al. 2001). Jelikož napadá hospodářská zvířata, způsobuje i ekonomické škody. U prasat způsobuje červenku. Při akutní července dochází k septikémii a mnohdy k úhynu zvířete. Subakutní forma se projevuje kožními poraněními, které se projevují až po několika dnech od nákazy bakterií. Chronická nákaza má za následek endokarditidy a ztuhlost zvířete (Wang et al. 2010b). Člověk se může *E. rhusiopathiae* nakazit při práci s nakaženým zvířetem skrz drobná poranění na vlastní kůži. U lidí se červenka projevuje jako lokální vyrážka na kůži (Tan et al. 2017).

Důkaz o přenosu *E. rhusiopathiae* čmelíkem byl proveden na švédské farmě, která byla nakažena červenkou slepic a zároveň napadena čmelíkem. Zjištěn byl jak přenos na povrchu těla čmelíka, tak i uvnitř. Přítomnost bakterie byla zkoumána kultivací (Chirico et al. 2003). Existuje ovšem i experiment, který přenos *E. rhusiopathiae* čmelíkem nepotvrdil. Jednalo se o experimentální nákazu slepic v separovaném chovu a umělou indikaci čmelíka do tohoto chovu. K vyhodnocení experimentu byl použit ELISA test. U tohoto experimentu nebyl prokázán přenos bakterie (Brännström et al. 2010).

4.3. *Chlamydia psittaci*

C. psittaci je obligatorní intracelulární gramnegativní bakterie (Spoorenberg et al. 2016). Běžnými hostiteli jsou ptáci patřící do řádu papoušků (*Psittaciformes*). U ptáků se projevuje načepýřeným peřím, neklidem a nechutenstvím, anemií a v mnoha případech až smrtí

napadeného organismu (Radomski et al. 2016). Člověk se může nakazit vdechnutím bakterie z ovzduší poblíž kletí okrasných ptáků. U něho vyvolává nákaza psitakózu. Nemoc se projevuje jako pneumonie (Lamoth & Greub 2010).

C. psittaci byla prokázána ve čmelíkovi, který masivně napadl farmu na chov okrasných ptáků v Itálii. Zde se chovali především kanárci divocí (*Serinus canaria*), stehlíci obecní (*Carduelis carduelis*) a hýlové obecní (*Phyrulla phyrulla*). Z uhynulých kanárek byly odebrány vzorky tkání a podrobeny PCR a kultivaci. Kultivací se nepodařilo získat žádné bakterie. Příčinou může být to, že *C. psittaci* patří mezi bakterie, jejichž kultivace je složitá. PCR byla prováděna na 16S RNA i na 23S RNA. Při obou metodách byly detekovány se 100% přesností geny *C. psittaci*. Stejně výsledky vykazovaly i vzorky odebrané ze čmelíka kuřího. (Circella et al. 2011). Není ovšem jisté, zda se čmelík pouze náhodně nenakazil během sání na infikovaných kanárcích a PCR detekovala bakterie v trávicí soustavě, které byly obsaženy ještě stále v krvi kanárka.

4.4. *Pasteurella multocida*

P. multocida je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie kokovitého tvaru. Běžně se vyskytuje jako komenzál v ústní dutině domácích zvířat, zejména pak koček a psů (Yuji et al. 2015). Onemocnění u zvířat způsobuje pouze při zhoršení imunity. Způsobuje onemocnění horních dýchacích cest a zánět plic.

Do člověka se nejčastěji dostává skrz kousnutí nebo škrábnutí od infikovaného domácího zvířete. Případně je možné se nakazit i vdechnutím prachových částic, ve kterých se *P. multocida* vyskytuje (Weber et al. 1984). Způsobuje u něj pasteurelózu, která se projevuje kožními abscesy, zánětlivými onemocněními kloubů, zánět kostní dřeně (osteomyelitida) nebo endokarditidami (Freshwater 2008).

O spojitosti čmelíka s *P. multocida* pojednávají pouze dvě práce (Petrov 1975; Valiente Moro et al. 2009), ostatní autoři se na ně odkazují. Petrov (1975) prokázal výskyt bakterie v čmelíkovi, který sál krev na přirozeně infikované drůbeži. Bakterie byla schopna přežít v čmelíkovi v závislosti na okolních podmínkách 42 až 64 dní. Valiente Moro et al. (2009) pro změnu použila PCR, kde detekovala velké množství bakterií a virů. Jednou z nich byla i *P. multocida*. Dále ovšem tento výskyt není komentován.

4.5. *Bartonella quintana*

B. quintana je bakterie patřící do čeledi *Bartonellaceae* (Hubálek & Rudolf 2011). Jedná se o gramnegativní fakultativně intracelulární bakterii. *B. quintana* má tvar krátké tyčky (Foucault et al. 2006). Bakterie je schopná kultivace. Tato kultivace trvá ale dlouhou dobu (řádově týdny). Standardním hostitelem bakterie je člověk, ve kterém se bakterie usadí v erytrocytech. *B. quintana* způsobuje zákopovou horečku. Tento název dostalo onemocnění během 1. světové války, kdy bylo zákopovou horečkou nakaženo přes milion lidí. Známé jsou i další názvy této nemoci např. volyňská nebo pětidenní horečka (Hubálek & Rudolf 2011). Typickými příznaky této nemoci jsou bolesti hlavy, zimnice a vysoká teplota. Teplota se po 3–7 dnech vrací zpět do normálu, ale opakovaně se vrací. (Foucault et al. 2006). *Bartonella* může také způsobovat endokarditidy nebo vzácněji kožní léze (Melter et al. 2012a, b).

B. quintana je přenášena vši šatní (*Pediculus humanus*). Veš se vyskytuje v blízkosti člověka. Nejčastěji lze nalézt v šatnících lidí, u kterých je zanedbávána hygiena a pravidelný úklid. Častěji se vyskytuje v chudších městských čtvrtích. Nejohroženějšími lidmi z hlediska nákazy vši a tedy potencionálně i *B. quintana*, jsou bezdomovci a lidé z okraje společnosti (alkoholici atd.). Veš způsobuje při sání na člověku svědivou alergickou reakci. *B. quintana* se ve vši vyskytuje v trávicím traktu, kde se množí a dostává se i do trusu. Do člověka se dostává skrz poraněnou pokožku z trusu vši (Foucault et al. 2006).

O spojitosti čmelíka a *B. quintana* pojednává práce, ve které je popsán výskyt zákopové horečky u rodiny ze standardních socioekonomických kruhů. Tato rodina se přestěhovala do podkroví domu ve městě v severním Česku. Pod střechou sídlili také holubi, kteří byli napadeni čmelíkem (Melter et al. 2012a, b). U této rodiny se začaly projevovat typické příznaky pro zákopovou horečku. Čmelíci byli pochyťáni na pokožce jednoho členů rodiny. Přítomnost *Bartonella* spp. byla prokázána pouze u čmelíků odchycených na otci čtvrtý den po vypuknutí nemoci. Pokus o odchycení holubů žijících na této střeše se nezdařil a testování holubů z okolí na přítomnost *B. quintana* bylo negativní (Melter et al. 2012a, b). Mimo tento druh rodu *Bartonella*, byly identifikovány v čmelíkovi kuřím bakterie nalezeny další bakterie skupiny *Rhizobiales* (Valiente Moro et al. 2009). Sekvence jsou podobné *Bartonella*, avšak při analýze nově získaných sekvencí z amplikonů téměř kompletní 16S rDNA bylo zjištěno, že tyto sekvence jsou nejvíce podobné symbiotickým bakteriím ve včelách, roztočích a mravencích (Hubert et al. 2017).

4.6. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes je bakterie z čeledi Listeriaceae. Tato bakterie patří mezi grampozitivní aerobní tyčkovité bakterie nevytvářející spóry. Přesto je schopná přežít i za nižších teplot. Kolonii *L. monocytogenes* lze snadno získat kultivací na běžných agarových médiích (Gray & Killinger 1966). *L. monocytogenes* má široké spektrum hostitelů. Lze ji nalézt v ovcích, drůbeži a prasatech. Je schopná ale i růstu a přežití v půdě, vodě a odpadcích, kde se živí jako saprofyt (Hubálek & Rudolf 2011). U zvířat způsobuje endokarditidy.

K přenosu bakterie na člověka dochází alimentární cestou skrz nakaženou potravu (Gray & Killinger 1966). Rizikovými potravinami z hlediska nákazy jsou čerstvé mléko, měkké sýry, syrové nebo nedostatečně tepelně upravené maso a syrová zelenina (Hubálek & Rudolf 2011). U člověka může dojít i k transplacentární infekci plodu od matky. U zdravých lidí se listerióza nějak zásadně neprojevuje. Problém nastává při nazeze imunodeficientních lidí. U těhotných žen dochází při nazeze k potratům nebo k úmrtím novorozence těsně po porodu (Gray & Killinger 1966). U starších lidí může způsobovat anginy a meningitidy. *L. monocytogenes* je často spojován i s mononukleózou (Hubálek & Rudolf 2011).

Současný výskyt čmelíka a *L. monocytogenes* byl popsán v Albertě (Kanada), kde byl chov kanárek napaden čmelíkem. Jako příčina úhynu byl označen právě čmelík. Při pozdější pitvě byly nalezeny v játrech bílé uzliny. Ty byly kultivovány na MacConkeyově agaru. Z uzlin se vykultivovala *L. monocytogenes* (Bigland 1950). Pro důkaz přenosu v této práci chybí vykultivování *L. monocytogenes* z čmelíka.

Práci, na kterou se ostatní články, které tvrdí, že je možný přenos *L. monocytogenes* čmelíkem, odkazují, je studie prováděná na farmě v Kyrgyzstánu v 70. letech 20. století. Původní práci se mi nepodařilo dohledat. Podle abstraktu se jednalo o přenos *L. monocytogenes* pomocí roztoče mezi divokými a domácími myši (Grebeňuk et al. 1972). Nevíme tedy, zda se jednalo konkrétně o čmelíka, nebo to byl jiný zástupce roztočů.

4.7. *Coxiella burnetii*

C. burnetii je obligátní intracelulární bakterie z čeledi Rickettsiaceae. Patří mezi gramnegativní bakterie s tvarem buňky mezi kokem a krátkou tyčkou (Kazar 2005). Je také velmi odolná vůči teple, tlaku a obecně okolním podmínkám. Její odolnost spolu s její vysokou schopností přenosu z jednoho jedince na dalšího činí z *C. burnetii* velmi sledovanou bakterii. Často napadá ovce a husy, dále pak ryby, hlodavce a ptáky (Heinzen et al. 1999). U zvířat způsobuje nemoc zvanou koksielóza, která většinou probíhá bez zjevných příznaků.

Občas se nemoc může projevit jako pneumonie (zápal plic) popřípadě může dojít k potratu u infikovaných samic savců (Hubálek & Rudolf 2011).

Člověk se nejčastěji *C. burnetii* nakazí vdechnutím bakterie přímo ze vzduchu při práci u infikovaného zvířete (Kazar 2005). U člověka způsobuje *C. burnetii* Q horečku. Akutní forma se projevuje jako horečka, zimnice a bolesti hlavy a kloubů. Úmrtí v případě akutní Q horečky výjimečné (Hubálek & Rudolf 2011). Chronická forma se projevuje až po letech a způsobuje endokarditidy, které jsou často letální (Kazar 2005).

O spojitosti *C. burnetii* a čmelíka pojednává pouze jediná práce. Podle této práce byla *C. burnetii* vyizolována z čmelíka a byla schopna v něm přežít až 6 měsíců. Zde byl dokonce popsán i přenos *C. burnetii* z morčat do ptáků a zpět (Zemskaja & Pčelkina 1967). Jedná se ale o relativně starou práci a nikdo další *C. burnetii* v čmelíkovi neobjevil.

5. Symbiotické bakterie čmelíka kuřího

V tělech členovců jsou často nalezeny endosymbiotické bakterie. Tyto bakterie napomáhají členovcům s obranou proti patogenům a s trávením živin (Zchori-Fein & Perlman 2004). U čmelíka jsou prokázáni endosymbionti *Wolbachia* a *Cardinium*. Problémem těchto bakterií je jejich přenos. Jsou sice schopni transovariálního i transstadálního přenosu, přenést do další generace se umí pouze z infikovaných vajíček nikoliv z infikovaných spermií (Werren 1997). Evolučně se k tomu ale dokázali přizpůsobit. Jedná se o reprodukční parazity (Zchori-Fein et al. 2001). Jsou schopni evokovat cytoplazmatickou inkompatibilitu (CI). CI je situace, kdy je omezena schopnost rozmnožování nakaženého samce s nenakaženou samicí a tím je zamezeno růstu nenakažené populace. Přesný způsob, kterým k CI dochází, není zatím známý (Zchori-Fein & Perlman 2004). Předpokládá se, že bakterie naváže na spermiu i na vajíčko určitý protein a pokud dojde k přenosu spermií z infikovaného jedince k infikovanému vajíčku, tyto proteiny do sebe zapadnou a zygota se dále normálně vyvíjí. Pokud nakažená spermie splývá s nenakaženým vajíčkem, dochází následně k úhynu zygoty (Werren 1997). Symbiotické bakterie jsou zajímavé pro člověka z hlediska regulace výskytu jejich hostitele.

5.1. *Wolbachia*

Wolbachia je bakterie patřící do čeledi Rickettsiaceae. Tato bakterie je typický endosymbiont členovců. *Wolbachia* se řadí mezi reprodukční parazity a je schopna provádět CI (Werren 1997) ale i další mechanismy, které zvyšují pravděpodobnost jejího přenesení se

do další generace a udržení se tak v populaci. Např. u blanokřídlých (Hymenoptera) je *Wolbachia* schopna indukovat partenogenezi (Stouthamer et al. 1999). Další možností, jak zvýšit pravděpodobnost výskytu v další generaci, je feminizace. Princip feminizace spočívá v potlačení aktivity žláz produkující androgeny, což má za následek vznik fenotypově se jevící samice (Werren 1997).

Výskyt *Wolbachia* v čmelíkovi byl potvrzen pomocí PCR, kde v jedné studii byly geny *Wolbachia* nalezeny s 93% přesností (Hubert et al. 2017). Další dvě práce ovšem v čmelíkovi za pomoci PCR tuto bakterii nenašly (De Luna et al. 2009; Valiente Moro et al. 2009).

5.2. *Cardinium*

Cardinium je bakterie z kmene *Bacteroidetes* patřící mezi intracelulární endosymbionty členovců (Kopecky et al. 2013). Obdobně jako u *Wolbachia* se jedná o reprodukčního parazita.

Spojitosť *Cardinium* s čmelíkem je prokázána za pomoci PCR. Geny *Cardinium* se objevily v 44 % vzorků z Francie a ve všech vzorcích čmelíka ze Spojeného království (De Luna et al. 2009). V Česku byla nalezena *Cardinium* v dospělci, larvě i vajíčku, což velmi naznačuje pravděpodobnost transovariálního přenosu (Hubert et. al 2017).

6. Závěr

- (1) S čmelíkem kuřím jsou spojovány bakterie a to jak patogenní, tak symbiotické.
- (2) Nicméně přímo potvrzen byl pouze přenos *Salmonella* spp., která byla ve čmelíkovi prokázána vícekrát jak za pomoci PCR, tak kultivací.
- (3) U dalších druhů bakterií je přenos čmelíkem nejistý. Přenos *Erysipelothrix rhusiopathiae* byl jednou studií potvrzen, ale při pokusu o experimentální nákazu a přenos se tato hypotéza nepotvrdila. Výskyt *Pasteurella multocida* byl ve čmelíkovi zjištěn dvakrát. Jednou za pomoci kultivace a podruhé pomocí PCR. Výskyt *Listeria monocytogenes* v čmelíkovi je spíše nepravděpodobný. Jednalo se pravděpodobně o výskyt čmelíka a bakterie pouze na jednom místě.
- (4) Další studie je potřeba i v případě spojitosti čmelíka a *Bartonella quintana*. Zde je popsán pouze jediný případ a není jisté prokázání přenosu z vrabce na člověka čmelíkem.
- (5) Symbiotické bakterie *Cardinium* a *Wolbachia* se v čmelíkovi také vyskytují. Jedná se o bakterie, které jsou schopny manipulovat s hostitelovým reprodukčním chováním. U bakterií *Cardinium* a *Wolbachia* je třeba podniknout další výzkum pro zjištění, jakým mechanismem způsobují změny pohlaví u svých hostitelů. Další prostor pro další studii je ve zkoumání souvislosti mezi četností výskytu samců a samic čmelíka a výskytem symbiotických bakterií v jejich těle.
- (6) Ačkoliv je mnoho dostupné literatury, kde je čmelík uváděn jako vektor bakterií, je pouze minimum informací o vzájemných interakcích bakterie a čmelíka.

Definice použitých výrazů

Alimentární infekce - infekce vstupující do organismu trávicím ústrojím, obvykle infikovanou potravou (Vokurka et al. 2015).

Anemie (chudokrevnost) – onemocnění, při němž je v krvi sníženo množství hemoglobinu a červených krvinek (Vokurka et al. 2015).

Endokarditida - zánět nitroblány srdeční (endokardu) (Vokurka et al. 2015).

Malpighické trubice - vychlípeniny zadní části trávicí soustavy. Mají hlavní funkci ve vylučovací soustavě členovců (Volf & Horák 2007).

Sérovar - skupina organismů zejména bakterií taxonomicky nižší než druh, odlišitelné od jiných skupin téhož druhu na základě sérologického vyšetření (Vokurka et al. 2015).

Transovariální přenos - přenos bakterií z matky do vajíčka skrz vaječníky (Vokurka et al. 2015).

Transstadiální přenos - přenos bakterií z jednoho vývojového stádia do dalšího (mediLexicon, 2017).

Obligatorní (parazit) - parazit zcela odkázaný na parazitický způsob života (Volf & Horák 2007).

Seznam použité literatury

- Auger, P., Nantel, J., Meunier, N., Harrison, R. J., Loisel, R., Gyorkos, T. W. 1979. Skin acariasis caused by *Dermanyssus gallinae* (de Geer): an in-hospital outbreak. Canadian Medical Association Journal 120(6):700–703.
- Bigland, C. H. 1950. A report on the isolation of *Listeria* (*Listerella*) organisms from a canary and a chicken in the province of Alberta. Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science 14(10):319–324.
- Brännström, S., Hansson, I., Chirico, J. 2010. Experimental study on possible transmission of the bacterium *Erysipelothrix rhusiopathiae* to chickens by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. Experimental and Applied Acarology 50(4):299–307.
- Cangelosi, Ch., Hannagan, S., Santiago, C. P., Wilson, J. W. 2015. Transfer of the cloned *Salmonella* SPI-1 type III secretion system and characterization of its expression mechanisms in Gram negative bacteria in comparison with cloned SPI-2. Microbiological Research 180:57–64.
- Circella, E., Pugliese, N., Todisco, G., Cafiero, M. A., Sparagano, O. A. E., Camarda, A. 2011. *Chlamydia psittaci* infection in canaries heavily infested by *Dermanyssus gallinae*. Experimental and Applied Acarology 55(4):329–338.
- Clark, M. F., Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34(3):475–483.
- Crowther, J. R. 2001. The ELISA guidebook. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Daniel, M., Kolár, J., Zeman, P., Pavelka, K., Sádlo, J. 1998. Predictive map of *Ixodes ricinus* high-incidence habitats and a tick-borne encephalitis risk assessment using satellite data. Experimental and Applied Acarology 22(7):417–433.
- Davies, R. H., Breslin, M. 2003. Persistence of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. Environmental Microbiology 5(2):79–84.
- De Luna, C. J., Valiente Moro, C., Guy, J. H., Zenner, L., Sparagano, O. A. E. 2009. Endosymbiotic bacteria living inside the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). Experimental and Applied Acarology 48(1–2):105–113.
- Foucault, C., Brouqui, P., Raoult, D. 2006. *Bartonella quintana* characteristics and clinical management. Emerging Infectious Diseases 12(2):217–223.
- Freshwater, A. 2008. Why your housecat's trite little bite could cause you quite a fright: a study of domestic felines on the occurrence and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida*. Zoonoses and Public Health 55(8–10):507–513.
- George, D. R., Finn, R. D., Graham, K. M., Mul, M. F., Maurer, V., Valiente Moro, C., Sparagano, O. A. E. 2015. Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science? Parasites and Vectors 8:178.
- Gray, M. L., Killinger, A. H. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriology Reviews 30(2):309–382.

- Grebeňuk, R. V., Čirov, P. A., Kadyševa, A. M. 1972. Roľ dikich životnych i krovososuščich členistonogich v epizootologii listerioza. Ilim, Frunze.
- Guy, J. H., Khajavi, M., Hlalel, M. M., Sparagano, O. 2004. Red mite (*Dermanyssus gallinae*) prevalence in laying units in Northern England. *British Poultry Science* 45(Supplement 1):S15–S16.
- Hajdušek, O., Šíma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., Kopáček, P. 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3:26.
- Hájková, Z., Krouz, J., Rosický, B. 1979. Roztoči a klíšťata škodící zdraví člověka. Academia, Praha.
- Heinzen, R. A., Hackstadt, T., Samuel, J. E. 1999. Developmental biology of *Coxiella burnettii*. *Trends in Microbiology* 7(4):149–154.
- Houghton, S. G., Cockerill, F. R. 2006. Real-time PCR: overview and applications. *Surgery* 139(1):1–5.
- Hubálek, Z., Rudolf, I. 2011. Microbial zoonoses and sapronoses. Springer, Dordrecht.
- Hubert, J., Erban, T., Kopecky, J., Sopko, B., Nesvorna, M., Lichovnikova, M., Schicht, S., Strube, Ch., Sparagano, O. 2017. Comparison of microbiomes between red poultry mite populations (*Dermanyssus gallinae*): predominance of *Bartonella*-like bacteria. *Microbial Ecology (in press)*. DOI: 10.1007/s00248-017-0993-z.
- Humphrey, T. J. 1994. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. *International Journal of Food Microbiology* 21(1–2):31–40.
- Chauve, C. 1998. The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Veterinary Parasitology* 79(3):239–245.
- Chirico, J., Eriksson, H., Fossum, O., Jansson, D. 2003. The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. *Medical and Veterinary Entomology* 17(2):232–234.
- Chmelař, J., Kotál, J., Karim, S., Kopacek, P., Francischetti, I. M. B., Pedra, J. H. F., Kotsyfakis, M. 2016. Sialomes and mialomes: a systems-biology view of tick tissues and tick–host interactions. *Trends in Parasitology* 32(3):242–254.
- Chu, T. T. H., Murano, T., Uno, Y., Usui, T., Yamaguchi, T. 2015. Molecular epidemiological characterization of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 77(11):1397–1403.
- Jenkins, C., Ling, C. L., Ciesielczuk, H. L., Lockwood, J., Hopkins, S., McHugh, T. D., Gillespie, S. H., Kibbler, Ch. C. 2012. Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *Journal of Medical Microbiology* 61(4):483–488.
- Joshi, M., Deshpande, J. D. 2011. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research* 2(1):81–97.

- Kazar, J. 2005. *Coxiella burnetii* infection. Annals of the New York Academy of Sciences 1063:105–114.
- Kilpinen, O. 2005. How to obtain a bloodmeal without being eaten by a host: the case of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. Physiological Entomology 30(3):232–240.
- Kirkwood, A. 1963. Longevity of the mites *Dermanyssus gallinae* and *Liponyssus sylviarum*. Experimental Parasitology 14(3):358–366.
- Kirkwood, A. C. 1967. Anaemia in poultry infested with the red mite *Dermanyssus gallinae*. Veterinary Record 80(17):514–516.
- Kopecky, J., Perotti, M. A., Nesvorna, M., Erban, T., Hubert, J. 2013. *Cardinium* endosymbionts are widespread in synanthropic mite species (Acari: Astigmata). Journal of Invertebrate Pathology 112(1):20–23.
- Lamoth, F., Greub, G. 2010. Fastidious intracellular bacteria as causal agents of community-acquired pneumonia. Expert Review of Anti-infective Therapy 8(7):775–790.
- Lazcka, O., Del Campo, F. J., Muñoz, F. X. 2007. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. Biosensors and Bioelectronics 22(7):1205–1217.
- Mans, B. J., Louw, A. I., Neitz, A. W. H. 2002. Evolution of hematophagy in ticks: common origins for blood coagulation and platelet aggregation inhibitors from soft ticks of the genus *Ornithodoros*. Molecular Biology and Evolution 19(10):1695–1705.
- Marangi, M., Cantacessi, C., Sparagano, O. A. E., Camarda, A., Giangaspero, A. 2014. Molecular characterization and phylogenetic inferences of *Dermanyssus gallinae* isolates in Italy within an European framework. Medical and Veterinary Entomology 28(4):447–452.
- Marangi, M., Morelli, V., Pati, S., Camarda, A., Cafiero, M. A., Giangaspero, A. 2012. Acaricide residues in laying hens naturally infested by red mite *Dermanyssus gallinae*. PLoS ONE 7(2):e31795.
- Masoumi, F., Youssefi, M. R., Tabari, M. A. 2016. Combination of carvacrol and thymol against the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). Parasitology Research 115(11):4239–4243.
- Melter, O., Arvand, M., Votýpka, J., Hulínská, D. 2012a. *Bartonella quintana* transmission from mite to family with high socioeconomic status. Emerging Infectious Diseases 18(1):163–165.
- Melter, O., Arvand, M., Votýpka, J., Hulínská, D. 2012b. *Bartonella quintana* transmission from mite to family with high socio-economic status. International Pest Control 54(1):22–23.
- Nechita, I. S., Poirel, M. T., Cozma, V., Zenner, L. 2015. The repellent and persistent toxic effects of essential oils against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. Veterinary Parasitology 214(3–4):348–352.
- Nordenfors, H., Höglund, J., Uggla, A. 1999. Effects of temperature and humidity on oviposition, molting, and longevity of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). Journal of Medical Entomology 36(1):68–72.
- Petrov, D. 1975. Proučvane vārhu nositelstvoto na *Pasteurella multocida* ot *Dermanyssus gallinae*.

- Phillis, W. A., Cromroy, H. L., Denmark, H. A. 1976. New host and distribution records for the mite genera *Dermanyssus*, *Ornithonyssus* and *Pellonyssus* (Acari: Mesostigmata: Laelapoidea) in Florida. *Florida Entomologist* 59(1):89–92.
- Radomski, N., Einkenel, R., Müller, A., Knittler, M. R. 2016. *Chlamydia*–host cell interaction not only from a bird's eye view: some lessons from *Chlamydia psittaci*. *FEBS Letters* 590(21):3920–3940.
- Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S., Shukla, S. K. 2003. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clinical Medicine and Research* 1(1):5–12.
- Romney, M., Cheung, S., Montessori, V. 2001. *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis and presumed osteomyelitis. *Canadian Journal of Infectious Diseases* 12(4):254–256.
- Rosen, S., Yeruham, I., Braverman, Y. 2002. Dermatitis in humans associated with the mites *Pyemotes tritici*, *Dermanyssus gallinae*, *Ornithonyssus bacoti* and *Androlaelaps casalis* in Israel. *Medical and Veterinary Entomology* 16(4):442–444.
- Roy, L., Chauve, C., Delaporte, J., Inizan, G., Buronfosse, T. 2009. Exploration of the susceptibility of AChE from the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Mesostigmata) to organophosphates in field isolates from France. *Experimental and Applied Acarology* 48(1–2):19–30.
- Slifko, T. R., Smith, H. V., Rose, J. B. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology* 30(12–13):1379–1393.
- Sparagano, O., Pavličević, A., Murano, T., Camarda, A., Sahibi, H., Kilpinen, O., Mul, M., van Emous, R., le Bouquin, S., Hoel, K., Cafiero, M. A. 2009. Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Experimental and Applied Acarology* 48(1–2):3–10.
- Sparagano, O. A. E., George, D. R., Harrington, D. W. J., Giangaspero, A. 2014. Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annual Review of Entomology* 59:447–466.
- Spoorenberg, S. M. C., Bos, W. J. W., van Hanne, E. J., Dijkstra, F., Heddema, E. R., van Velzen-Blad, H., Heijligenberg, R., Grutters, J. C., de Jongh, B. M., Ovidius study group. 2016. *Chlamydia psittaci*: a relevant cause of community-acquired pneumonia in two Dutch hospitals. *Netherlands Journal of Medicine* 74(2):75–81.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J., Hurst, G. D. D. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* 53:71–102.
- Tan, E. M., Marcelin, J. R., Adeel, N., Lewis, R. J., Enzler, M. J., Tosh, P. K. 2017. *Erysipelothrix rhusiopathiae* bloodstream infection – a 22-year experience at Mayo Clinic, Minnesota. *Zoonoses and Public Health*. DOI: 10.1111/zph.12348.
- Thind, B. B., Ford, H. L. 2007. Assessment of susceptibility of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) to some acaricides using an adapted filter paper based bioassay.

- Veterinary Parasitology 144(3–4):344–348.
- Tucci, E. C., Prado, A. P., Araújo, R. P. 2008. Development of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) at different temperatures. Veterinary Parasitology 155(1–2):127–132.
- Uhlík, O., Strejček, M., Hroudová, M., Demnerová, K., Macek, T. 2013. Identifikace a charakterizace bakterií s bioremediačním potenciálem – od kultivace k metagenomice. Chemické listy 107(8):614–622.
- Valiente Moro, C., Desloire, S., Chauve, C., Zenner, L. 2007a. Detection of *Salmonella* sp. in *Dermanyssus gallinae* using an FTA[®] filter-based polymerase chain reaction. Medical and Veterinary Entomology 21(2):148–152.
- Valiente Moro, C., Chauve, C., Zenner, L. 2007b. Experimental infection of *Salmonella enteritidis* by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. Veterinary Parasitology 146(3–4):329–336.
- Valiente Moro, C., Thioulouse, J., Chauve, C., Normand, P., Zenner, L. 2009. Bacterial taxa associated with the hematophagous mite *Dermanyssus gallinae* detected by 16S rRNA PCR amplification and TTGE fingerprinting. Research in Microbiology 160(1):63–70.
- Vokurka, M., Hugo, J., et al. 2015. Velký lékařský slovník. 10. aktualizované vydání. Maxdorf, Praha. Též dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz>
- Volf, P., Horák, P. 2007. Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha.
- Wang, F. F., Wang, M., Xu, F. R., Liang, D. M., Pan, B. L. 2010a. Survey of prevalence and control of ectoparasites in caged poultry in China. Veterinary Record 167(24):934–937.
- Wang, Q., Chang, B. J., Riley, T. V. 2010b. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Veterinary Microbiology 140(3–4):405–417.
- Warrell, M. J., Warrell, D. A. 2004. Rabies and other lyssavirus diseases. Lancet 363(9413):959–969.
- Weber, D. J., Wolfson, J. S., Swartz, M. N., Hooper, D. C. 1984. *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. Medicine 63(3):133–154.
- Werren, J. H., 1997. Biology of *Wolbachia*. Annual Review of Entomology 42:587–609.
- Yuji, D., Tanaka, M., Katayama, I., Noguchi, K. 2015. *Pasteurella multocida* infective endocarditis. Journal of Heart Valve Disease 24(6):778–779.
- Zeman, P., Štika, V., Skalka, B., Bártík, M., Dusbábek, F., Lávičková, M. 1982. Potential role of *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 in the circulation of the agent of pullurosis-typhus in hens. Folia Parasitologica 29(4):371–374.
- Zemskaja, A. A., Pčelkina, A. A. 1967. Gamazovyje klešči i lichoradka KU. In: Problemy parazitologii: 5-ja ukra inskaja respublikanskaja naučnaja konferencija parazitologov (1967; Kijev): tezisy dokladov. Naukova dumka, Kyjiv, pp. 358–359.
- Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y., Kelly, S. E., Brown, J. K., Wilson, J. M., Karr, T. L., Hunter, M. S. 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98(22):12555–12560.

Zchori-Fein, E., Perlman, S. J. 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology* 13(7):2009–2016.

Webové stránky

- EOL. 2017. *Dermanyssus gallinae* (chicken mite). Encyclopedia of life (EOL). Dostupné z: <http://eol.org/pages/3191724/overview> [cit. 2017-5-7].
- mediLexicon. 2017. Transstadial transmission. In: mediLexicon, Bexhill-on-Sea. Dostupné z: <http://www.medilexicon.com/dictionary/93326> [cit. 2017-5-7].
- SVS ČR. 2017. Národní programy tlumení salmonel – Metodika kontroly zdraví a nařízené vakcinace na rok 2017. Státní veterinární správa České republiky (SVS ČR), Praha. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/programy-tlumeni-vyskytu-salmonel/> [cit. 2017-5-7].
- NCBI. 2017. Polymerase chain reaction (PCR). National Center for biotechnology information. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechPCR.shtml> [cit. 2017-5-7].